

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—77354

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 31/22  
C 12 Q 1/00  
G 01 N 21/76  
33/58

識別記号  
G A B

庁内整理番号  
6514—2G  
8213—4B  
6637—2G  
8305—2G

⑭ 公開 昭和59年(1984)5月2日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

## ⑮ 化学発光増感法

⑯ 特 願 昭57—187433

⑰ 出 願 昭57(1982)10月27日

⑱ 発 明 者 今井一成

国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番  
地株式会社日立製作所中央研究  
所内

⑲ 発 明 者 小林映章

国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番  
地株式会社日立製作所中央研究  
所内

⑳ 出 願 人 株式会社日立製作所  
東京都千代田区丸の内1丁目5  
番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 薄田利幸

## 明 細 書

発明の名称 化学発光増感法

## 特許請求の範囲

1. 化学発光物質を発光させる系に、環状基を有するアミノ酸を共存させて発光強度を増強させることを特徴とする化学発光増感法。
2. アミノ酸としてフェニルアラニンを用いることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の化学発光増感法。
3. 上記化学発光物質が有機高分子化合物に結合していることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の化学発光増感法。

## 発明の詳細な説明

## 〔発明の利用分野〕

本発明は化学発光物質の検出法に係り、特に化学発光物質の定量、並びに化学発光の計測を基とする免疫定量、酵素定量等の感度向上に好適な、化学発光の増感法に関するものである。

## 〔従来技術〕

化学発光物質は、19世紀末にロフィンが、

20世紀初めにルミノール、ルンゲニンが発見されて以来、各種研究されてきており、その発光強度(発光効率)、発光波長などは溶媒の種類、pH、発光物質の置換基、触媒の存在などに依存して大きく変化することが知られている。

フルオレッセイン、ローダミンなどの蛍光色素を化学発光系に共存させると、その発光がしばしば、これらの蛍光に変わることが知られており、たとえば、電子線ビーム(electron beam)を用いたルミノールの発光において、フルオレッセインを共存させると最高150%にまで発光量が増加することがハース等によつて報告されている(Y. Haas & E. Wuerzberg, J. Phys. Chem., 83, 2692-2696 (1979))。

また、バシレフ(V. I. Vasilev)らによつて、ルミノールを電気化学的に発光させた場合(Electrochemiluminescence)に、フルオレッセインの共存により、発光が、フルオレッセインの蛍光に変わり、発光強度が増すことが報告されている(Khim. Vys. Energ., 8, 465 (1974))。

化学的な触媒によつて発光を開始させた場合についても、ルシン(B. A. Rusin)らによつて、ルミノールをC(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系の触媒で発光させる際に、フルオレッセインを共存させると、ルミノールの発光が、フルオレッセインの螢光に変わることが報告されている(B. A. Rusin, et al., Khim. Vys. Energ., 10, 89-91 (1976))。

しかし、螢光色素以外の、例えばアミノ酸などを用いて、発光量の増加を報告した例はない。

一方、化学発光物質を用いた免疫定量法(Chemiluminescence immunoassay)については、特に近年その研究が盛んになつてきており、例えば、ヒトIgGにルミノールを標識してヒトIgGを測定したハーシュ(L. S. Hersh)等の報告(Anal. Biochem., 93, 267 (1979))、抗ウサギIgGにルミノールを標識してウサギIgGを測定したシンプソン(J. S. A. Simpson)等の報告(Nature, 279, 646 (1979))、テストステロン・アルブミンにルミノールを標識してテストステロン

を測定したプラット(J. J. Pratt)等の報告(J. Immunol. Methods, 21, 179 (1978))、T<sub>4</sub>にイソルミノールを標識してT<sub>4</sub>を測定したシュローダー(H. R. Schroeder)等の報告(J. Immunol. Method, 25, 275 (1979))等が知られている。これらの報告は、いずれも原理的なものであり、感度においても、他の測定法と比較して、特にすぐれたものではない。また研究の主眼が、化学発光物質の標識方法、及び高発光効率の化学発光物質誘導体の探索におかれている。

化学発光物質の検出感度は、例えばルミノールの場合で、約1 pM程度であり、ゆえに、ケミルミネッセンスイムノアッセイの測定感度は、これを上回することは困難である。

#### 〔発明の目的〕

本発明は、化学発光を増感することにより、例えばケミルミネッセンスイムノアッセイのような化学発光物質の検出の感度を向上させるものである。

#### 〔発明の概要〕

化学発光物質は、ルミノール(luminol)、ロフィン(lophin)、ルシゲニン(lucigenin)、など各種知られているが、その量子収率はルミノールの場合でも、せいぜい1%程度と低いものである。また、一般的に、これらの誘導体では、量子収率はさらに低いことが多い。

一方、化学発光物質の計測を応用した例であるケミルミネッセンスイムノアッセイにおいては、極微量生体成分を直接計測するかわりに、ルミノールのような化学発光物質を、被測定物質と同種の抗原又はこれに対する抗体に標識として結合させ、この標識した化学発光物質の発光量を計測して、間接的に被測定物質を定量する。したがって、ケミルミネッセンスイムノアッセイの感度は、化学発光物質の発光量(発光収率)に依存することになる。

化学発光物質の量子収率の小さいことは、前にも述べたが、抗体あるいは抗原等と結合することによりさらに低下する(Simpson, et al., Nature, 279, 646-647 (1979)、等)。このことが、

ケミルミネッセンスイムノアッセイの感度を下げていることは明らかである。各種化学発光物質誘導体の利用、及び結合方法の検討がなされているが、必ずしも感度は上がっていない(H. R. Schroeder, et al., J. Immunol. Method, 25, 275 (1979)等)。

発光収率が低下する原因としては、種々考えられるが、その1つに他分子等へのエネルギー移動が考えられる。もし、このエネルギー移動を抑制すること、あるいは、エネルギー移動後もなんらかの手段でエネルギーを光エネルギーとして取り出すことが可能ならば全体としての収率を向上させられる。

この方法の1つとして、フルオレッセイン等の螢光色素を共存させ、発光量を増加させる方法が提案されているが、効果の大きいフルオレッセインなどでは、それ自身の発光によりバックグラウンドを上げ、化学発光物質の濃度が小さい領域でのS/N比を悪化させている。

本発明者らは環状基を有するアミノ酸(例えば、

フェニルアラニン)を共存させた化学発光系を取り上げ、実験を行なっている過程で、ルミノール等の化学発光の減衰速度が低下し、積算発光量が増加する現象を発見した。この際使用したアミノ酸自身が単独で化学発光を示すことはなかつた。

本発明は、上記の発見に基づき、化学発光物質の定量時に、媒状態を有するアミノ酸を共存させ、検出する発光量を増強させることにより、検出感度を上げ、前記の欠点を解決したものである。

また、近年、臨床検査などの分析に多種類の酵素が用いられるようになってきた。そのうち酸化酵素は安定性及び反応生成物の検出などの点で優れており、広く用いられようとしている。酸化酵素が特定の基質に作用すると、酵素反応による基質の変化に伴い、一般に酸素が消費され、過酸化水素が生じる。酸化酵素を使用した分析においては、この過酸化水素の量を計測することが多いが、ここに化学発光物質、例えばルミノール、を適用すると極めて高感度、高精度の計測が可能となる。本発明はこのような計測の検出感度の向上にも適

用出来る。

#### [ 発明の実施例 ]

化学発光物質としては、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、ルシゲニン、スカトール等が良く知られているが、以下では、ケミルミネツセンシウムアツセイで、標識物質として、すでに利用されているルミノールを例にとり説明する。

発光系に共存させるアミノ酸としては、水溶性の比較的高いフェニルアラニンを例にとり説明する。

#### 実施例 1

$10^{-1}$  N NaOH に溶かした  $10^{-5}$  M ルミノール溶液  $20 \mu\text{L}$  を、 $1 \text{ cm}$  角型、石英発光セルに入れ、 $50 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液  $0.1 \text{ mL}$  と  $1 \text{ mM}$  NaOCl の  $10^{-1}$  N NaOH 溶液  $1 \text{ mL}$  を加えることにより発光させ、フオトンカウンタで計数した。この際、一つの発光系には、あらかじめ  $10^{-5}$  M のフェニルアラニン水溶液  $100 \mu\text{L}$  を加え、もう一つの発光系には、蒸留水  $100 \mu\text{L}$  を加え、その発光量の相違を調べた。この際、触媒の注入は、

ポンプにより、流量、流速を制御した。

発光の減衰曲線は、第1図のとおりであつた。

a は、発光系に蒸留水を加えた場合であり、b は発光系にフェニルアラニンを加えた場合である。

a の場合、発光量は単調に減少するだけであるが、b の場合、初め a と同様に減少するが、発光開始後  $50$  秒ごろから再び発光量が増加する。やがて、極大値に達するが、減衰速度は緩やかである。

発光量で比較すると、発光開始後  $60$  秒間の積算値で、a は  $3.3 \times 10^5 \text{ counts} / 60 \text{ 秒}$  に対し、b は、やや小さい  $2.8 \times 10^5 \text{ counts} / 60 \text{ 秒}$  であるが、発光開始後  $120$  秒間の積算値では、a は  $3.7 \times 10^5 \text{ counts} / 120 \text{ 秒}$  に対し、b は、 $4.3 \times 10^5 \text{ counts} / 120 \text{ 秒}$  と大きくなる。 $4$  分間 ( $240$  秒間) の積算では、a が、 $3.9 \times 10^5 \text{ counts} / 240 \text{ sec}$  であるのに対し、b が、 $7.2 \times 10^5 \text{ counts} / 240 \text{ sec}$  となり、b の積算値が a の積算値の約  $2$  倍となつている。積算時間を長くすれば、この差はますます広がる。

フェニルアラニン濃度を変えて ( $10^{-5}$  M ~

$10^{-1}$  M) 実験を行なつた結果、

- (1) 第1図 b で見られるような、発光開始後約  $50$  秒付近からの減衰速度の低下、あるいは、発光量の増加は、 $10^{-5}$  M から観察されるが、低濃度 ( $10^{-5}$  M 以下) ではその効果が小さい。
- (2) 高濃度 ( $10^{-2}$  M 以上) では、フェニルアラニンによる吸光により、発光量が減少するとともに、上記の現象も観察されない。
- (3) フェニルアラニンだけの発光を測定したが、いずれの濃度においても、ブランクレベル以上の発光量は観測されなかつた。

この系においては、 $10^{-4}$  ~  $5 \times 10^{-3}$  M で増感効果が最大となる。

ルミノールの濃度を変えて実験を行なつた結果を、第2図に示す。a は、発光系に蒸留水を加えた場合、b は、発光系にフェニルアラニン水溶液を加えた場合である。実験の方法は、前と同様であり、フェニルアラニンの濃度は  $10^{-3}$  M である。フオトンカウントが可能な領域にわたつて、フェニルアラニン添加の効果が、ルミノール濃度に依

存せず、ルミノールフェニルアラニン系においても、ルミノールだけの場合と同様に、ルミノール濃度と発光量に比例関係が成立した。

上記の例では、ルミノールのみについて示したが、他の発光物質でも同様である。

使用するアミノ酸の種類、濃度、及び量は、測定する化学発光物質の性質、アミノ酸の性質、発光の際の触媒系及び測定装置の特性などにより最適化されなければならないことは勿論である。

また、本発明は、発光物質が生物活性物質（例えば抗体）などの有機高分子化合物に結合している場合にも用いることができる。

#### 〔発明の効果〕

本発明によれば、化学発光量が2～3倍以上に増強されるので化学発光物質の検出感度を上げることができる。さらに、化学発光物質を標識化合物として用いたケミルミネッセンスイムノアッセイに応用すれば、分析感度を上げることができるという効果がある。

図面の簡単な説明

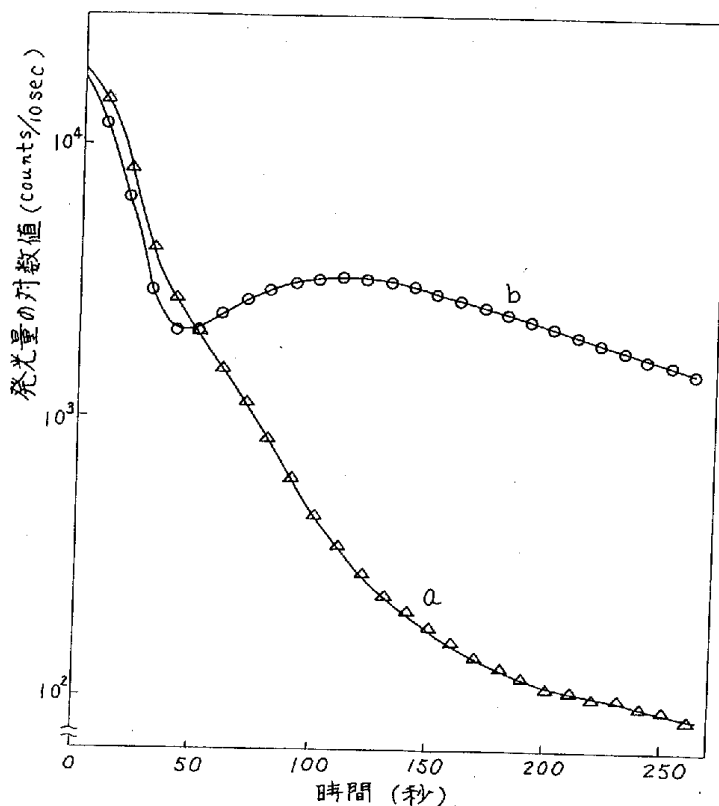
第1図は、発光の減衰を表わす図、第2図は、発光量のルミノール濃度による変化を表わす図である。

a…発光系に蒸留水を加えた場合の発光量、b…発光系にフェニルアラニン水溶液を加えた場合の発光量。

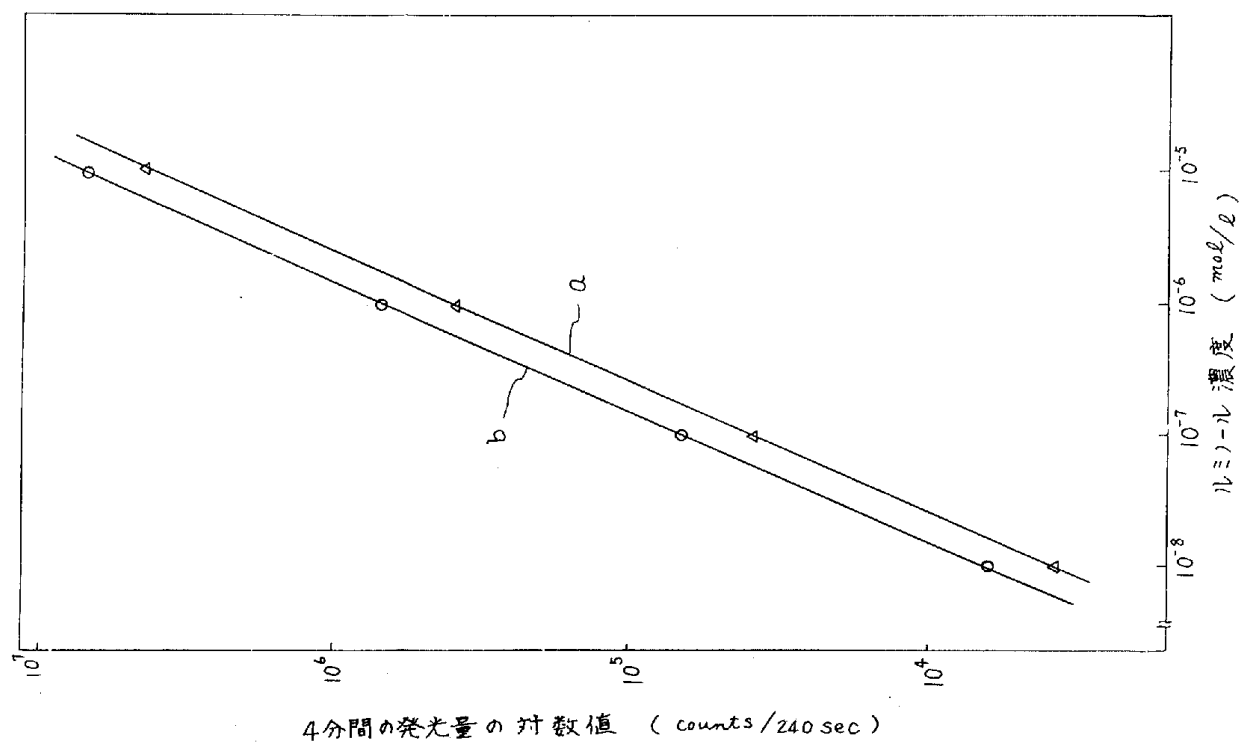
代理人 弁理士 薄田利幸



第 1 図



第 2 図



PAT-NO: JP359077354A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 59077354 A  
TITLE: CHEMILUMINESCENCE SENSITIZATION  
PUBN-DATE: May 2, 1984  
INVENTOR-INFORMATION: IMAI, KAZUNARI; KOBAYASHI, TERUAKI  
ASSIGNEE-INFORMATION: HITACHI LTD  
APPL-NO: JP57187433  
APPL-DATE: October 27, 1982  
INT-CL (IPC): G01N031/22, C12Q001/00 , G01N021/76 , G01N033/58  
US-CL-CURRENT: 435/4  
ABSTRACT:

PURPOSE: To improve the sensitivity in detection of a chemiluminescent substance, by allowing an amino acid with a cyclic radical to co-exist in a system which causes a chemiluminescent substance to be luminous, thereby to increase the luminous intensity.

CONSTITUTION: A ruminole solution dissolved in NaOH is placed in a square quartz fluorescence cell and is made luminous by adding to the ruminole solution an aqueous  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution and an NaOCl solution in NaOH. An aqueous phenylalanine solution as an amino acid with a cyclic radical is previously added to the luminescent system. In this luminescent system, the luminous quantity first decreases but increases again when a predetermined time has elapsed after the start of luminescence to reach a maximum value and then attenuates gently.

L35 ANSWER 189 OF 319 CA COPYRIGHT 2008 ACS on STN

AN 101:143259 CA

OREF 101:21556h,21557a

TI Chemiluminescence sensitization

PA Hitachi, Ltd., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.

PI JP 59077354 A 19840502 JP 1982-187433 19821027

PRAI JP 1982-187433 19821027

AB An improvement in the detection sensitivity of a chemiluminescent substance (e.g. luminol) was obtained by adding phenylalanine to a NaOH soln. contg. luminol,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and NaOCl.